

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 533 209**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
(21) N° d'enregistrement national : **82 15976**  
(51) Int Cl<sup>3</sup> : C 07 C 103/52; B 01 F 17/22; C 09 K 3/34.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

(22) Date de dépôt : 22 septembre 1982.

(30) Priorité

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 12 du 23 mars 1984.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(71) Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RE-  
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) — FR.*

(72) Inventeur(s) : Bernard René Maurice Gallot et André  
Doy.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Harlé et Phélip.

(54) Lipopeptides, leur obtention et leur application comme émulsifiants.

(57) Les lipopeptides selon l'invention sont amphipatiques et  
sont constitués d'une chaîne hydrophobe comprenant de 8 à  
24 atomes de carbones environ et d'une chaîne peptidique  
hydrophile ou rendue hydrophile.

Applications notamment aux émulsions de milieux non mis-  
cibles et à l'obtention de cristaux liquides liotropes.

**FR 2 533 209 - A1**

D

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention concerne la synthèse de lipopeptides, et plus particulièrement de lipopeptides amphipatiques, et l'application de ces composés comme émulsifiants ou comme cristaux liquides.

5 L'invention a pour premier objet une nouvelle classe de lipopeptides, qui sont des lipopeptides amphipatiques composés d'une chaîne hydrophobe comprenant au moins 8 atomes de carbone environ, et de préférence de 8 à 24 atomes de carbone environ, et d'une chaîne peptidique hydrophile ou  
10 rendue hydrophile.

Les lipopeptides selon l'invention peuvent être définis par la formule générale:



dans laquelle  $C_n$  représente une chaîne hydrophobe ayant  
15 au moins 8 atomes de carbone environ, et de préférence 8 à 24 atomes de carbone environ, et PP représente un polypeptide obtenu à partir des acides aminés naturels ou de leurs dérivés, (de configuration l ou d, l). En pratique le polypeptide PP est formé d'un ou plusieurs acides aminés, selon le degré  
20 de polymérisation retenu, ce dernier pouvant être de 1 ou plus. La nomenclature de certaines, parmi les plus courantes, des séquences peptidiques qu'il est possible d'utiliser est regroupée plus loin dans le tableau I.

Par chaîne hydrophobe on entend de préférence, mais non  
25 exclusivement, une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement substituée, ayant un nombre d'atomes de carbone tel qu'indiqué.

On a obtenu ces composés selon une technique elle-même nouvelle.

30 L'invention a donc également pour objet un procédé pour l'obtention de lipopeptides amphipatiques tels que définis ci-dessus, consistant fondamentalement à:

1) -réaliser un couplage peptidique entre une amine  
35 grasse et un amino acide N-protégé, pour obtenir un lipopeptide dont la chaîne peptidique a un degré de polymérisation de 1, et, si l'on désire obtenir

## B

un d gré de polymérisation d 2 ou 3 pour la chaîne peptidique, réaliser un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur, ou

- 5 2a) effectuer la polymérisation du N-carboxy-anhydride de l' amino acide en l'initiant par une amine grasse, pour obtenir des lipopeptides dont les chaînes peptidiques ont des degrés de polymérisation supérieurs à 3, et
- 10 2b) si on le désire, fractionner en composition les lipopeptides de l'étape 2a), et
- 3) excepté dans le cas où la chaîne peptidique du produit de l'étape 1) et/ou 2a) ou 2b) est directement une chaîne hydrophile, débloquent la chaîne latérale des chaînes peptidiques hydrophobes pour la rendre hydrophile,
- 15

Comme on le voit, la méthode de synthèse à employer dépend de la longueur de la chaîne peptidique désirée.

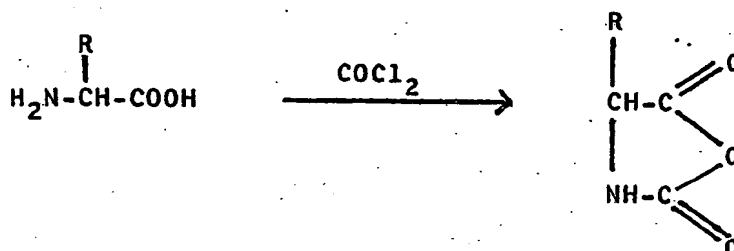
- Pour obtenir des lipopeptides à degré de polymérisation 1, 2 ou 3, on procède par couplage peptidique entre l'amine grasse de formule  $C_nNH_2$ , où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et l' amino acide dont l'atome d'azote amino est protégé, par exemple par le groupement tert-butyl-oxycarbonyl (en abrégé Boc); on débloquent cet atome d'azote amino et on débloquent l'atome d'azote amino après chaque étape.
- 20

- 25 Pour obtenir des lipopeptides dont le degré de polymérisation de la chaîne peptidique est supérieur à 3, on polymérise le N-carboxy-anhydride (en abrégé NCA) de l' amino acide en initiant la polymérisation par l'amine grasse  $C_nNH_2$ . On réalise ensuite, si on le désire, un fractionnement en composition (la séquence lipidique étant monodispersé), par précipitation sélective des lipopeptides, et on obtient une série de lipopeptides qui diffèrent par leur composition en peptides.
- 30

Les peptides monomères mis en oeuvre sont des produits commerciaux ou sont préparés de manière connue.

- 35 Le monomère utilisé pour la partie peptidique des lipopeptides selon l'invention n'est pas l'acide aminé lui-même,

mais son dérivé cyclique, le N-carboxy-anhydride d'acide-amino (NCA), obtenu par action du phosgène sur l'acide-amino selon la réaction:



On prépare les NCA dans le THF, en faisant réagir sur l'acide-amino une solution de phosgène dans le THF. Cette méthode est une variante de la méthode de Fuller, Verlander et Goodman (Biopolymers, 15, (1967), dans laquelle le solvant du phosgène est le benzène.

L'amine grasse  $\text{C}_n\text{NH}_2$  est soit une amine commercialement disponible, soit obtenue à partir de l'acide gras en  $\text{C}(n+1)$  par la réaction de dégradation de Schmidt utilisant l'azide de sodium en milieu acide fort (Indian J. Technol., 5, 262, (1967)). Le choix d'une chaîne  $\text{C}_n$  ayant de 8 à 24 atomes de carbone environ n'est pas critique, mais tient uniquement à la plus grande disponibilité des produits correspondants. Cette chaîne hydrophobe  $\text{C}_n$  peut être une chaîne hydrocarbure quelconque, mais elle peut aussi comporter des substituants et/ou des hétéro-atomes, pour autant qu'ils n'influent pas défavorablement sur le processus de synthèse.

On décrit ci-après, en référence à la nomenclature exposée au tableau I, successivement la préparation de lipopeptides hydrophobes et leur transformation en lipopeptides amphipatiques, et la préparation directe de lipopeptides amphipatiques.

#### A-1 Synthèse de lipopeptides hydrophobes ( $\text{C}_n\text{Eb}$ , $\text{C}_n\text{Db}$ et $\text{C}_n\text{Kt}$ )

On dissout l'amine grasse ( $\text{C}_n\text{NH}_2$ ) dans le chloroforme, puis on ajoute le NCA d'acide aminé approprié et on laisse

polymériser à la température ambiante, sous agitation, pendant deux jours. On obtient ainsi les lipopeptides CnEb possédant une séquence peptidique de poly(glutamate de benzyle), CnDb possédant une séquence peptidique de poly(aspartate de benzyle) et CnKt possédant une séquence peptidique de polytrifluoroacétyllysine.

A titre d'exemple, pour la synthèse de lipopeptides C17Kt, on utilise de l'heptadécylamine obtenue à partir de l'acide stéarique (voir Indian J. Technol. 5, 262(1967)). Pour obtenir plus précisément du C17 Kt de degré de polymérisation 10 (DP= 10) , on ajoute à 2,55g (0,01 mole) d'amine en C17 en solution dans 150 ml de chloroforme , 27g (0,1 mole ) de NCA de trifluoroacétyllysine et on laisse polymériser à température ambiante sous agitation pendant plusieurs heures. Le chloroforme est ensuite évaporé, le résidu est repris dans le méthanol et le polymère est précipité dans l'eau, puis est filtré, lavé et séché.

A-2) Transformation de lipopeptides hydrophobes en lipopeptides amphipatiques

20 1. Lipopeptides CnK

On a préparé les lipopeptides CnK possédant une séquence hydrophile de polylysine (K) à partir des lipopeptides CnKt par la méthode de Sela et al. (Biopolymers, 1, 517, (1963)). On traite les lipopeptides CnKt en solution dans le THF, d'abord par une solution de pipéridine dans le méthanol, puis par une solution de pipéridine dans l'eau.

A titre d'exemple illustrant une transformation de C17 Kt en C17K, 5g de C 17Kt sont dissous dans 150 ml d'une solution molaire de pipéridine dans le méthanol à température ambiante. Après 2 heures, on ajoute 100 ml d'une solution molaire de pipéridine et on laisse 48 heures à température ambiante. On élimine le méthanol à l'évaporateur et on passe la solution sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Duolite A 102 D, forme OH<sup>-</sup>) pour éliminer les anions trifluoroacétate et on lyophilise pour récupérer le C17K.

## 2. Lipopeptides CnE et CnD

On obtient les lipopeptides CnE possédant une séquence hydrophile d'acide poly-glutamique (E) et CnD possédant une séquence hydrophile d'acide poly-aspartique (D) à partir des lipopeptides CnEb et CnDb en traitant ces lipopeptides par HCl et HBr à température ambiante (J. Am. Chem. Soc., 80, 4631, (1958)).

## 3. Lipopeptides CnEp

On prépare les lipopeptides CCnEp possédant une séquence hydrophile de poly-hydroxypropylglutamine (Ep) en traitant les lipopeptides CnEb par l'aminopropanol à 60°C en solution dans le dioxane (Biopolymers, 3, 625, (1965)).

## 4. Lipopeptides CnEe

On prépare les lipopeptides CnEe possédant une séquence hydrophile de poly-hydroxyéthylglutamine (Ee) en traitant les lipopeptides CnEb par l'éthanolamine à 60°C en solution dans le dioxane (Biopolymers, 9, 717, (1970)).

## B-Synthèse de lipopeptides amphipatiques

On dissout l'amine grasse CnNH<sub>2</sub> dans le chloroforme, puis on ajoute le NCA d'acide aminé et on laisse polymériser, à température ambiante, sous agitation, pendant deux jours. On obtient ainsi les lipopeptides CnSar possédant une séquence peptidique de polysarcosine.

Pour illustrer plus concrètement le procédé de synthèse de lipopeptides selon l'invention, on décrit ci-après la synthèse des lipopeptides amphipatiques C17Sar formés d'une chaîne aliphatique contenant 17 atomes de carbone (C17) et d'une chaîne de polysarcosine (Sar).

### 1. Synthèse de lipopeptides de degré de polymérisation supérieur à 3.

L'heptodécylamine C17NH<sub>2</sub> obtenue à partir de l'acide stéarique (voir Indian J. Technol., 5, 262, (1967)) est d'abord dissoute dans le chloroforme, puis on y ajoute la quantité de NCA de sarcosine calculée pour obtenir le degré de polymérisation choisi. Par exemple, si on veut obtenir du C17Sar de degré de polymérisation 10 (DP:10), à 2,55g(0,01 mole)d'amine en C17, en solution dans 100 ml de



chloroforme, on ajoute 11,5g de NCA de sarcosine (0,1 mole) et on laisse polymériser à température ambiante, sous agitation pendant 48 heures.

On fractionne les lipopeptides C17Sar par précipitation fractionnée en utilisant le mélange solvant/précipitant DMF/acétone.

2. Synthèse de lipopeptides de degrés de polymérisation 1, 2 et 3.

Pour obtenir des lipopeptides de degrés de polymérisation 1, 2 et 3, on procède par couplage peptidique entre l'amine grasse et l'acide aminé protégé par le groupement tert-butyl-oxycarbonyl (Boc).

Les Boc-acides aminés sont préparés à partir de l'acide aminé et du di-tert-butyl-dicarbonate par la méthode de Morsder et al (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357 1651, (1976).)

a) Synthèse de C17Sar

$\alpha$ ) C17BocSar: on obtient le produit C17BocSar en couplant l'heptadécylamine au BocSar par l'intermédiaire du dicyclohexylcarbodiimide (DCCI). On mélange à froid (à 0°C), dans 100 ml de chloroforme, 3,78 g (0,02 mole) de BocSar et 2,06 g (0,01 mole) de DCCI. Il se forme un précipité abondant de dicyclohexylurée (DCU). On laisse 30 minutes à 0°C sous agitation et on ajoute 2,55 g (0,01 mole) d'heptadécylamine. On laisse la réaction se poursuivre pendant 20 heures. On filtre, on lave le précipité, on récupère le filtrat, on évapore le chloroforme, on reprend le résidu dans 50 ml de THF, on refroidit à 0°C, on filtre pour éliminer le maximum de dicyclohexylurée, et on lave le précipité avec un minimum de THF froid.

$\beta$ ) C17Sar, HCl: au filtrat, on ajoute 20 ml d'HCl en solution 5 N dans du THF et on laisse sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Il se forme un précipité abondant de C17Sar, HCl, qu'on filtre et lave au THF.

$\gamma$ ) C17Sar: on reprend le précipité dans 100 ml de THF et on chauffe à 50°C, puis on ajoute 2 ml de triéthylamine et on laisse reposer pendant 2 heures. On refroidit à 0°C,

on filtre le précipité de chlorhydrate de triéthylamin ,  
on évapore le THF et on recristallise le C17 Sar dans  
l'acétone.

On obtient 2,1g de C17Sar (rendement 65%)

5      b) Synthèse de C17Sar2

Pour obtenir du C17Sar2, on opère de la même manière  
mais on part de C17Sar et de BocSar.

c) Synthèse de C17Sar3

10      Pour obtenir du C17Sar3, on opère de la même manière,  
mais on part de C17Sar2 et de BocSar.

La structure des lipopeptides selon l'invention a été  
étudiée par la technique de diffraction des rayons X.

15      On a ainsi pu établir que les lipopeptides amphipati-  
ques présentent des mésophases à structure périodique en  
solution aqueuse pour des concentrations en eau inférieures  
à 60% environ et que la structure périodique peut être  
conservée à l'état sec par évaporation lente de l'eau de la  
mésophase. Les lipopeptides amphipatiques selon l'invention  
constituent ainsi une nouvelle classe de cristaux liquides  
20      liotropes et ils peuvent avoir les mêmes applications que  
ces cristaux liquides.

La structure des lipopeptides amphipatiques est mainte-  
nant décrite plus en détails en référence à l'exemple des  
lipopeptides C17Sar constitués d'une chaîne aliphatique pos-  
25      sédant 17 atomes de carbone et d'une chaîne de polysarcosine,  
dont on a fait varier le degré de polymérisation de 1  
à 60.

Les lipopeptides C17Sar présentent un double polymor-  
phisme: en fonction de la longueur de la chaîne polypepti-  
30      dique d'une part et en fonction de la teneur en eau d'autre  
part. Les lipopeptides adoptent, suivant leur composition,  
trois types de structures: lamellaires pour les degrés de  
polymérisation (DP) inférieurs à 9, hexagonale pour les DP  
compris entre 10 et 35 environ et cubique centrée pour les DP  
35      supérieurs à environ 35. De plus, les lipopeptides peuvent  
présenter un polymorphisme en fonction de la teneur en eau  
de leurs mésophases. L'addition d'eau modifie le rapport en-

tre les volumes des phases hydrophile et hydrophobe et peut faire passer la structure de lamellaire à hexagonale (pour les DP compris entre 5 et 9 environ) ou d'hexagonale à cubique (pour les DP compris entre 17 et 35 environ).

5 L'invention a donc également pour objet l'application des lipopeptides amphipatiques à la constitution de cristaux liquides liotropes.

10 Les mésophases de lipopeptides amphipatiques peuvent en outre incorporer de nombreux composants, tant hydrophiles qu'hydrophobes, tels que : alcools, acides, paraffines, huile de carnation, stéarate d'éthyle, palmitate d'isopropyle, etc..., et donner ainsi par exemple des laits ou des crèmes, dont on peut faire varier facilement la viscosité en jouant sur la structure des mésophases, elle-même déterminée par la  
15 longueur respective des séquences hydrophobes et peptidiques des lipopeptides.

On a également testé les propriétés émulsifiantes des lipopeptides amphipatiques vis-à-vis de nombreux couples de liquides non miscibles tels que eau/hydrocarbures et eau/  
20 produits de base de l'industrie des cosmétiques. On a étudié le type et la stabilité des émulsions obtenues par la méthode des colorants sélectifs, la méthode des dilutions, la conductivité électrique, la cryofracture et la microscopie électronique.

25 Pour obtenir des émulsions, on ajoute aux deux liquides non miscibles environ 1% en poids de lipopeptide amphipatique ( $C_{17}$ Sar, DP=1, par exemple), on agite avec un agitateur magnétique et l'émulsion se forme facilement. On a ainsi préparé des émulsions de différentes compositions avec les systèmes eau/octane, eau/huile de carnation, eau/stéarate d'éthyle et eau/palmitate d'isopropyle. Les émulsions obtenues  
30 sont très stables (plusieurs mois) et résistent à des élévations de température jusqu'à 60°C environ.

L'invention a donc en outre pour objet l'application des lipopeptides amphipatiques comme émulsifiants et les  
35 émulsions comprenant des lipopeptides amphipatiques à titre d'agent émulsifiant, en pratique de l'ordre de 1% en poids. ou plus.

On peut faire varier à volonté la solubilité et l'affinité pour différents solvants des lipopeptides en jouant sur la longueur de la chaîne aliphatique et sur la nature de la chaîne peptidique. On peut aussi modifier facilement la balance hydrophile-hydrophobe de tels lipopeptides en jouant sur la longueur de la chaîne aliphatique et sur le degré de polymérisation de la chaîne peptidique.

Les lipopeptides amphipatiques selon l'invention donnent facilement des émulsions très stables pour des teneurs en lipopeptides très faibles (environ 1% en poids) contre 15-16% avec les agents de surface classiques. De plus ils ont l'avantage d'être réalisés avec des composants naturels (lipides et peptides). Ces lipopeptides amphipatiques peuvent trouver une application comme agents émulsifiants de milieux non miscibles dans des domaines très divers, par exemple dans l'industrie cosmétique (crèmes hydratantes, crèmes antirides, vernis, dissolvants de vernis, etc.), dans l'industrie alimentaire (moutardes, mayonnaises, etc...) et dans l'industrie pétrolière (additifs pour huiles, récupération assistée de pétrole), entre autres.

**TABLEAU I**  
**Nomenclature des séquences peptidiques**

Désignation	Nom du polypeptide	Formule de la chaîne latérale
Eb	Poly(glutamate de benzyle)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
Ep	Poly(hydroxypropylglutamine)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
Ee	Poly(hydroxyéthylglutamine)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$
E	Poly(acide glutamique)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
Db	Poly(aspartate de benzyle)	$-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
D	Poly(acide aspartique)	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Kt	Poly(trifluoroacétyllysine)	$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{CF}_3$
K	Polylysine	$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
S	Polysérine	$-\text{CH}_2-\text{OH}$
T	Polythréonine	$-\text{CH}-\text{OH}$   $\text{CH}_3$
Sar	Polysarcosine (+)	

(+) Polysarcosine :  $(-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$   
|  
 $\text{CH}_3$

REVENDEICATIONS

1. Lipopeptides, caractérisés en ce qu'ils sont amphipatiques et sont constitués d'une chaîne hydrophobe comprenant de 8 à 24 atomes de carbone environ et d'une chaîne peptidique hydrophile ou rendue hydrophile.

5 2. Lipopeptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale



10 dans laquelle  $C_n$  représente une chaîne hydrophobe ayant de 8 à 24 atomes de carbone environ, et PP représente un polypeptide obtenu à partir des acides aminés naturels ou de leurs dérivés.

3. Procédé pour l'obtention de lipopeptides selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste fondamentalement à

15 1) - réaliser un couplage peptidique entre une amine grasse et un amino acide N-protégé, pour obtenir un lipopeptide dont la chaîne peptidique a un degré de polymérisation de 1 et, si l'on désire obtenir un degré de polymérisation de 2 ou 3 pour la chaîne peptidique, réaliser  
20 un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur, ou

25 2a) - effectuer la polymérisation du N-carboxy-anhydride de l'acide amino en l'initiant par une amine grasse, pour obtenir des lipopeptides dont les chaînes peptidiques ont des degrés de polymérisation supérieurs à 3, et

2b) - si on le désire, fractionner en composition les lipopeptides de l'étape 2a), et

30 3) - excepté dans le cas où la chaîne peptidique du produit de l'étape 1) et/ou 2a) ou 2b) est directement une chaîne hydrophile, débloquer la chaîne latérale des chaînes peptidiques hydrophobes pour la rendre hydrophile.

35 4. Procédé selon la revendication 3 pour l'obtention de lipopeptides ayant un degré de polymérisation de 1, 2 ou 3, caractérisé en ce qu'on effectue un couplage peptidique entre une amine grasse de formule  $C_nNH_2$  où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et l'acide amino dont l'atome d'azote amino est

protégé, par exemple par le groupement tert-butyl-oxycarbonyle, obtenant ainsi un lipopeptide ayant un degré de polymérisation de 1, et pour obtenir des lipopeptides ayant un degré de polymérisation de 2 ou 3 pour la chaîne peptidique on réalise un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur.

5. Procédé selon la revendication 3 pour l'obtention de lipopeptides dont le degré de polymérisation de la chaîne peptidique est supérieur à 3, caractérisé en ce qu'on polymérise le N-carboxy-anhydride de l'acide amino en initiant la polymérisation par une amine grasse  $C_nNH_2$  où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et on réalise ensuite, si on le désire, un fractionnement en composition par précipitation sélective des lipopeptides, obtenant ainsi une série de lipopeptides qui diffèrent par leur composition en peptides.

6. Application des lipopeptides selon l'une des revendications 1 ou 2 à l'obtention de cristaux liquides liotropes.

7. Cristaux liquides, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un lipopeptide selon l'une des revendications 1 ou 2.

8. Application des lipopeptides selon l'une des revendications 1 ou 2 comme émulsifiants.

9. Emulsions de milieux non miscibles, caractérisées en ce qu'elles comprennent, de préférence à raison d'environ 1% en poids, au moins un lipopeptide selon l'une des revendications 1 ou 2.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**